



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap**

Institutionen för Biomedicin och Veterinär
Folkhälsovetenskap

Fumonisin B₁: toxiska effekter och verkningsmekanismer för toxicitet

Linnea Eknefelt

*Uppsala
2015*

Kandidatarbete 15 hp inom veterinärprogrammet

Kandidatarbete 2015:47

Fumonisin B₁: toxiska effekter och verkningsmekanismer för toxicitet

Fumonisin B₁: toxic effects and mechanisms for toxicity

Linnea Eknefelt

Handledare: Jonas Tallkvist, institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap

Examinator: Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap

Kandidatarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurskod: EX0700

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen / Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Delnummer i serie: 2015:47

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: fumonisin B1, FB1, ekvin leukoencefalomalaci, ELEM, hole in the head syndrome,
lungödem gris, PPE, fusarium, levertoxicitet, njurtoxicitet, carcinogent

Key words: fumonisin B1, FB1, equine leukoencephalomalacia, ELEM, hole in the head syndrome,
porcine pulmonary edema, PPE, fusarium, liver toxicity, kidney toxicity, carcinogenic

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt	4
Fumonisin påverkan på sfingolipidsyntesen.....	4
Ekvin leukoencefalomalaci (ELEM).....	4
Porcine pulmonary edema (PPE)	5
Lever- och njurtoxicitet.....	5
Carcinogenicitet	6
Ökad endotelpermeabilitet	6
Hjärt-kärlförändringar	7
Toxikokinetik	7
Skadlig dos och gränsvärden i foder	7
Diagnostik	8
Diskussion	9
Slutsats	11
Referenslista	11

SAMMANFATTNING

Mykotoxinet fumonisin B₁ som förekommer i hela världen på framförallt majs, har visats ge upphov till flera olika toxiska effekter hos en mängd olika djurslag. De mest specifika är leukoencefalomalaci hos häst (ELEM) och lungödem hos gris (PPE), men även skador i lever, njurar och hjärt-kärlsystemet samt carcinogenicitet har observerats. Effekterna skiljer sig en hel del mellan olika djurslag, vilket den här uppsatsen syftade att hitta möjliga anledningar till. Dessutom var syftet att sammanställa information om fumonisins verkningsmekanismer – både bekräftade och mer osäkra sådana, samt beskriva de toxiska effekterna hos olika djur och i olika organ och även ta upp diagnostisering, vilken dos som krävs för att orsaka sjukdom samt jämföra de rekommenderade gränsvärden som har satts upp för fumonisiner i foder med forskningsresultat. Fokus i den här uppsatsen ligger på häst och gris då det är de som är känsligast för fumonisinförgiftning.

Den lilla fraktion av toxinet som absorberas efter oralt intag distribueras brett i kroppen via blodet. Det utövar sin toxicitet genom att inhibera ceramidsyntas och därmed hämma produktionen av sfingolipider och orsaka en ansamling av enzymets substrat, nämligen sfinganin och sfingosin, som i sin tur tros orsaka flera av de skador som ses vid fumonisinförgiftning. Verkningsmekanismerna för uppkomsten av de olika sjukdomarna är inte helt klarlagda, men flera olika teorier tas upp och diskuteras i uppsatsen. Sfingosin, sfinganin och komplexa sfingolipider deltar i många olika intracellulära signalvägar och är nödvändiga för reglering av många funktioner i cellen. När koncentrationerna av dessa substanser ändras störs regleringen de deltar i och därmed flera olika funktioner i kroppen, vilket tros ligga till grund för uppkomsten av de sjukdomssymptom som ses vid fumonisinförgiftning. Sfingolipider har dessutom strukturella funktioner i bland annat cellmembranet. Både EU och amerikanska FDA har satt upp rekommendationer för maximal halt fumonisiner i foder, men de skiljer sig lite åt. Även i de försök som har gjorts för att bestämma säker dos varierar resultaten och det förekommer stora individuella skillnader.

Forskarna har kommit en bit på väg att reda ut hur FB₁ kan leda till de skador som har observerats, men det är fortfarande mycket som är oklart. Att FB₁ hämmar ceramidsyntas och orsakar ansamling av sfingoida baser råder enighet om, men exakta mekanismer för uppkomsten av de olika sjukdomssymptomen är något som behöver forskas mer på.

SUMMARY

The mycotoxin fumonisin B₁, which can be found worldwide on primarily corn, has been proved to cause various toxic effects in many different animal species. The most specific effects for this toxin is equine leukoencephalomalacia (ELEM) and porcine pulmonary edema (PPE), but damage to the liver, kidneys and cardiovascular system and carcinogenicity has also been observed. The effects differ between species, which this essay aimed to find explanations for. The purpose was also to compile available information about the mechanisms of action of fumonisin B₁ – both confirmed and more uncertain ones, describe the toxic effects in different animal species and organs and write about detection, what dose is sufficient to cause disease and compare the guidelines for fumonisins in feed with the scientific research. The main focus in this essay is on pigs and horses since they are the most sensitive to fumonisin poisoning.

The small fraction of toxin that is absorbed from the intestine is widely distributed in the body by the blood. FB₁'s toxicity is due to its ability to inhibit ceramide synthase and thereby inhibit the production of sphingolipids and cause an accumulation of the substrates of the enzyme, sphinganine and sphingosine, which are thought to cause several types of damage associated with fumonisin poisoning. The pathogenesises of the fumonisin related diseases are not completely clear, but several different theories are presented and discussed in the essay. Sphingosine, sphinganine and complex sphingolipids take part in many different intracellular signaling pathways and are necessary for regulating many of the functions in the cell. When the concentrations of these substances change, the regulation they are involved in is disturbed and consequently also several functions in the body, which is thought to be the reason for the development of the diseases seen in fumonisin poisoning. Sphingolipids also have structural functions in for instance the cell membrane. Both the EU and the American FDA have recommended guidelines for maximum levels of fumonisins in feed, although they differ a little bit from each other. The experiments carried out to determine safe levels of fumonisin have also had different results and there are large variations between individuals of the same species.

Researchers have made some progress in understanding how FB₁ can lead to the damages that have been observed, but there are still many uncertainties. No one seems to question that FB₁ inhibits ceramide synthase and causes an accumulation of sphingoid bases, but the exact mechanisms responsible for the pathological changes in the animals needs to be further investigated.

INLEDNING

Fumonisin är en grupp mykotoxiner som produceras av flera olika, men inte alla, *Fusarium* species. *Fusarium verticillioides* (hette tidigare *F. moniliforme* Sheldon) och *F. proliferatum* är två exempel på viktiga arter eftersom de producerar relativt mycket toxiner, har stor geografisk utbredning och ofta förekommer på majs som är en viktig gröda för både djur och människor (Rheeder *et al.*, 2002). Det är just majs som har varit i centrum i fumonisinforskningen eftersom det är där *Fusarium* spp är vanligast och orsakar mest problem, men det kan även förekomma på andra grödor, t.ex. durra (Bhat *et al.*, 1997). Under 1989-1990 drabbades USA av utbrott där många hästar och grisar dog av fumonisinorsakad ekvin leukoencefalomalaci (ELEM) (Wilson *et al.*, 1990) respektive porcine pulmonary edema (PPE) (Osweiler *et al.*, 1992). Fumonisin har orsakat sporadiska sjukdomsutbrott även i andra länder runtom i världen, t.ex. Sydafrika, Brasilien, Argentina, Kina och Egypten (Sydenham *et al.*, 1992). Även om halterna i fodret ofta inte är tillräckligt för att orsaka akut toxicitet kan det ändå innebära stora ekonomiska förluster på grund av minskad produktion då t.ex. grisar får minskad tillväxt p.g.a. subklinisk sjukdom orsakad av fumonisin (Morgavi & Riley, 2007).

Det finns 28 beskrivna fumonisinanaloger som delas in i 4 grupper: A, B, C och P, där grupp B, som i sin tur utgörs av B₁, B₂ och B₃ (kan även skrivas som FB₁₋₃), är de vanligast förekommande. Enbart fumonisin B₁ står vanligen för 70-80 % av den totala mängden fumonisin som produceras (Rheeder *et al.*, 2002). FB₁, som den här uppsatsen kommer att fokusera på, har visats ge upphov till leukoencefalomalaci hos häst (ELEM) (Marasas *et al.*, 1988; Kellerman *et al.*, 1990; Ross *et al.*, 1993), lungödem (PPE) hos gris (Gumprecht *et al.*, 1998; Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2002), verka cancerfrämjande hos bland annat råttor, ha toxiska effekter på lever och njurar hos flera djurslag (Gelderblom *et al.*, 1988) och är även toxiskt för hjärt-kärlsystemet hos grisar (Smith *et al.*, 1996a; Smith *et al.*, 1996b; Constable *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000) och hästar (Smith *et al.*, 2002). Det finns även misstankar om att fumonisin kan orsaka cancer hos människor (Yoshizawa *et al.*, 1994).

Den här litteraturstudien är gjord i syfte att sammanställa information om vad som händer med fumonisin i kroppen, vad det har för toxiska effekter på olika djurslag, med huvudfokus på häst och gris, och diskutera vad dessa skillnader kan bero på. Även diagnosticering och vilken dos som är skadlig är av intresse.

MATERIAL OCH METODER

Den här litteraturstudien genomfördes genom att sammanställa information från vetenskapliga artiklar. Majoriteten av dessa har hittats på nätet via sökning i Google Scholar, Primo och Web of Science. Sökord som användes inkluderar: fumonisin, FB₁, equine leukoencephalomalacia, porcine pulmonary edema, sphingolipids etc. Även kombinationer med dessa ord och "fumonisin" i kombination med diverse ord, t.ex. "fumonisin AND metabolism". En del källor hittades genom referenslistorna på liknande artiklar.

Avgränsning gjordes med avseende på språk (endast engelska och svenska) och huruvida artikeln av intresse gick att få tag på i sin helhet på ett enkelt och inte allt för kostsamt vis.

LITTERATURÖVERSIKT

Fumonisin påverkan på sfingolipidsyntesen

Fumonisin är strukturellt lika sfinganin och sfingosin, som ingår i biosyntesen av andra sfingoida baser och sfingolipider. Sfingolipider, som är en stor grupp molekyler, har både strukturella funktioner som byggstenar i t.ex. cellmembranet, och reglerande funktioner i cellen. De är bland annat prekursorer till sekundära budbärare som medierar cellens svar på exempelvis tillväxthormon, cytokiner och differentieringsfaktorer (Merill *et al.*, 2001). Verkningsmekanismen för fumonisin B₁ är att det inhiberar ceramidsyntas (sfinganin/sfingosin-N-acetyltransferas), som katalyserar acetyleringen av de sfingoida baserna sfinganin och sfingosin vilket leder till en minskad syntes av mer komplexa sfingolipider. En samtidig konsekvens av detta är en ansamling av ceramidsyntas substrat, framförallt sfinganin men även sfingosin, samt en vänsterförskjutning av förhållandet sfinganin:sfingosin (Wang *et al.*, 1991). Den störda biosyntesen av sfingolipider är en trolig orsak till flera av de sjukdomssymptom som förknippas med fumonisin, vilket kommer att diskuteras mer ingående i kommande avsnitt.

Ekvin leukoencefalomalaci (ELEM)

ELEM, även kallat "hole in the head syndrome" på grund av de kaviteter som uppstår i hjärnan till följd av nekros av hjärnvävnaden, är en neurologisk sjukdom hos hästdjur som har visats orsakas av FB₁ (Marasas *et al.*, 1988; Kellerman *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1993). ELEM karakteriseras av multifokala kollikvationsnekroser (förvätskningsnekroser) i framförallt den vita substansen i de cerebrala hemisfärerna, men kan även drabba andra delar av det centrala nervsystemet såsom cerebellum, hjärnstam och ryggmärg och även den grå substansen kan påverkas. Hästarna kan även få ödem i hjärnan i varierande grad (Marasas *et al.*, 1988). ELEM kan ge neurologiska symptom som t.ex. depression, nervositet, apati, cirkelgång, ataxi, "head pressing", pares, blindhet och död (Marasas *et al.*, 1988; Caloni & Cortinovis, 2010).

Degenerationen av nervceller som sker vid ELEM kan bero på den hämmade sfingolipidsyntesen, eftersom neuronerna i hjärnan innehåller mycket sfingolipider. Harel & Futerman (1993) visade att minskad axontillväxt korrelerade med inhiberad biosyntes av komplexa sfingolipider till följd av inhibering av ceramidsyntas p.g.a. FB₁, och föreslår att sfingolipidsyntesen är nödvändig för att förse det växande axonet med byggmaterial till membranet.

Smith *et al.* (2002) föreslår att hjärnödemet kan uppkomma till följd av skador på hjärtskärlssystemet orsakade av FB₁, vilket beskrivs längre ner i uppsatsen. När hästen sänker huvudet för att t.ex. äta och dricka måste det ske en automatisk vasokonstriktion i vissa kärl för att bibehålla normalt blodtryck i hjärnan. Om den mekanismen inte fungerar som normalt skulle blodtrycket i hjärnan öka och kunna ge upphov till de ödem och skador i hjärnan som ses vid ELEM (Smith *et al.*, 2002).

Andra patologiska fynd som har observerats på hästar som har intoxikerats med FB₁ inkluderar: hepatos, mild nefros, ödem i submucosan i grovtarmen och mild blodstockning och ödem i lungor (Marasas *et al.*, 1988).

Porcine pulmonary edema (PPE)

Grisar påverkas på flera sätt av fumonisiner, men tycks vara det enda djurslaget som drabbas av dödligt lungödem (PPE). Vid experimentellt inducerad PPE med oral giva på 20 mg FB₁/kg kroppsvikt/dag framträdde sjukdomen efter 3-4 dagar. Ingen av grisarna i experimentet överlevde längre än 4 dagar. Symptom inkluderar plötslig inaktivitet, ökad andningsfrekvens, mer ansträngd andning, vidgade näsborrar och kräkningar. Död inträffar inom några timmar efter att grisen börjat få svårigheter att andas (Gumprecht *et al.*, 1998).

I ett försök att förklara fumonisins specificitet till just lungor hos grisar resonerar Gumprecht *et al.* (1998) att det kan ha att göra med att grisar har mycket Pulmonary Intravascular Macrophages (PIMs) jämfört med andra djurslag. PIMs producerar flera olika vasoaktiva mediatorer, t.ex. tromboxan, prostacykliner, prostaglandiner och leukotriener. Höga nivåer av sfingosin är cytotoxiska för makrofager, och ändrade koncentrationer av sfingoida baser eller komplexa sfingolipider skulle kunna inducera produktion av dessa vasoaktiva mediatorer och slutligen resultera i att mer vätska läcker ut från kärlen och ansamlas i lungorna hos grisar (Gumprecht *et al.*, 1998). Fler teorier kring uppkomsten av PPE tas upp senare i uppsatsen.

Lever- och njurtoxicitet

Fumonisiner har påvisade toxiska effekter på både lever och njurar hos flera olika djurslag, bland annat häst (Ross *et al.*, 1993), gris (Gumprecht *et al.*, 1998) och råttor (Riley & Voss, 2006). Sfingoida baser, exempelvis sfinganin och sfingosin har cytotoxiska egenskaper när de ansamlas i för hög koncentration, då det inhiberar proteinkinase C som har flera viktiga uppgifter som bidrar till att upprätthålla cellens funktion (Stevens *et al.*, 1990). Effekten blir inducerad apoptos och hyperplasi (Dragan *et al.*, 2001) vilket naturligtvis påverkar organens funktion negativt.

Riley & Voss (2006) undersökte toxiciteten av fumonisiner i lever respektive njurar hos råttor. Det visar sig att hos några rättstammar är njurarna mer känsliga för fumonisin, medan andra stammar har högre känslighet i levern. FB₁ inhiberar ceramidsyntas med samma potens i både lever och njure. Njuren fick dock en högre koncentration av sfinganin och sfinganin-1-fosfat (Sa-1-P), som är en sfinganinmetabolit, vilket sannolikt beror på metaboliska skillnader mellan de två organen; njurarna har en mer begränsad kapacitet att degradera sfinganin och Sa-1-P (även sfingosin och sfingosin-1-fosfat, men de är av mindre betydelse) vilket orsakar en större ansamling av denna produkt. En annan möjlighet är att njurarna skulle kunna ta upp sfinganin och/eller Sa-1-P från blodet som ursprungligen bildats i andra vävnader i kroppen men på så vis ackumuleras i njurarna. Något som stödjer denna hypotes är att halten Sa-1-P i serum vid fumonisinintoxikation är betydligt lägre hos råttor, vars njurar är känsliga för FB₁, än hos grisar och hästar hos vilka njuren inte är ett målorgan. Det är därför tänkbart att andra vävnader, framför allt levern, under inverkan av FB₁ bildar ovan nämnda metaboliter som sedan i någon mån deponeras i blodet och

tas upp i njurarna hos de råttor som har den predispositionen, men hos andra djurslag stannar de kvar i blodet i större utsträckning (Riley & Voss, 2006). Varför det skiljer sig mellan olika rättstammar är mer oklart.

Carcinogenicitet

Det har gjorts flera studier där fumonisiner har kunnat kopplas till carcinogenicitet, bland annat har de visats vara hepatocarcinogena i experiment med råttor (Gelderblom *et al.*, 1988). Det finns även misstankar om att de kan bidra till esofaguscancer hos människor, grundade på epidemiologiska studier (Yoshizawa *et al.*, 1994). Verkningsmekanismen bakom detta tros vara att FB₁, genom störd sfingolipidsyntes, kan inducera apoptos eftersom flera sfingolipidmetaboliter deltar i regleringen av apoptos. Till följd av apoptosen sker sedan en regeneration av vävnaden för att ersätta förlorade celler, d.v.s. celldelningen ökar. Detta skulle kunna vara förklaringen till fumonisins carcinogena effekt, eftersom en öknad mitotisk aktivitet samtidigt ökar risken för att spontana mutationer kan uppkomma som förändrar cellens tillväxt och leder till neoplas. Ett agens kan alltså öka risken för cancer, inte bara genom att skada DNA direkt och ge upphov till mutationer, utan även genom att orsaka celldöd och därmed stimulera till ökad celldelning och i förlängningen fler tillfällen då mutationer kan uppstå (Dragan *et al.*, 2001).

Ökad endotelpermeabilitet

Mycket höga nivåer av sfinganin fungerar troligtvis som en detergent som löser upp och ökar permeabiliteten av cellmembranet (Stevens *et al.*, 1990). Ramasamy *et al.*, (1995) kunde i sitt experiment på endotelceller från lungartärer på gris *in vitro* visa att FB₁, genom att hämma sfingolipidsyntesen och därmed öka sfinganinhalten i cellen, orsakade en ökad genomsläpplighet av albumin över cellmembranet. Anledningarna till den ökade membranpermeabiliteten föreslås av Ramasamy *et al.*, (1995) vara följande: 1) sfingolipider deltar i cell-cellkontakter, så en brist på dessa borde försämra sammanhållningen av cellerna så att läckage mellan cellerna kan förekomma i högre grad, 2) sfingolipider kan ha en roll i signalvägar som styr membranpermeabiliteten hos endotelceller och 3) eftersom FB₁, medierat av ökade sfinganinnivåer, är cytotoxiskt och tillväxthämmande kan det även tänkas att förlusten av endotelceller p.g.a. apoptos ger en försvagad barriär. Ramasamy *et al.*, (1995) drar slutsatsen att FB₁ ökar genomsläppligheten av grisars endotel och att det skulle kunna vara en del av förklaringen till uppkomsten av lungödem hos grisar (PPE) vid fumonisininförgiftning. Men Smith *et al.*, (2000) menar tvärt emot att fumonisininducerad PPE orsakas av vänstersidig hjärtsvikt, vilket tas upp mer i nästa stycke, och inte ökad endotelpermeabilitet eftersom de i *in vivo* experiment inte kunnat uppmäta någon skillnad i kapillärernas permeabilitet. Även hästar har fått ödem vid fumonisininförgiftning, men då främst i hjärnan (Marasas *et al.*, 1988; Kellerman *et al.*, 1990).

Hjärt-kärlförändringar

Även det cirkulatoriska systemet kan påverkas vid fumonisinförgiftning. Minskad hjärtfrekvens, hjärtminutvolym, hjärtkontraktilitet, genomsnittligt arteriellt blodtryck, syretryck i blodet och systemisk syretillförsel har observerats hos grisar, samt ökat genomsnittligt blodtryck i lungartärerna, ökad syreförbrukning och ökat "oxygen extraction ratio" (andel av O₂ i kapillärerna som diffunderar ut till vävnaderna) (Smith *et al.*, 1996a; Smith *et al.*, 1996b; Constable *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). Liknande försämringar i hjärt-kärlsystemet har kunnat ses hos hästar vid experimentellt inducerad FB₁-förgiftning (Smith *et al.*, 2002).

Sfingosin har en viktig roll som intracellulär sekundär budbärare och inhiberar då kalciumkanaler i hjärtmuskelceller vilket sannolikt är anledningen till att FB₁, som leder till ansamling av sfingosin, minskar hjärtats kontraktilitet eftersom hjärtmuskelcellen behöver kalcium för att kontrahera (Dettbarn *et al.*, 1994).

Toxikokinetik

En studie gjord på råttor visade att absorptionen av oralt administrerat FB₁ från magtarmkanalen är låg, men inte obefintlig, då upp till 80 % av dosen sedan återfanns i feces och 3 % i urinen. Vid intravenös injektion uppmättes att 30 % av dosen fanns i levern och 10 % i njurarna 96 timmar efter administrering. Upp till 10 % av den intravenösa dosen elimineras via urinen och upp till 35 % i feces enligt samma studie (Norred *et al.*, 1993). Den orala biotillgängligheten är väldigt låg även hos grisar, men den fraktion som väl absorberas distribueras ut i hela kroppen och kan stanna kvar länge i kroppen på grund av enterohepatisk cykling och affinitet till vissa vävnader: lever och njurar hade de högsta nivåerna, följt av grovtarm, hjärna, lungor och binjurar. Elimination sker både via urin och galla (Prelusky *et al.*, 1994). Idislare är inte lika känsliga för fumonisiner som exempelvis häst och gris. Det skulle, enligt Prelusky *et al.* (1995), kunna bero på att de absorberas mycket dåligt i magtarmkanalen, och dessutom elimineras snabbt från plasma och tas upp dåligt av vävnaderna. Det finns inte bevis för att FB₁ metaboliseras i kroppen, utan det utsöndras i oförändrad form eller med en eller båda trikarboxylsyra-sidokedjorna förlorade, vilket tros ske i tarmen, eftersom den hydrolyserade formen har hittats i feces men inte i galla (Bolger *et al.*, 2001).

Skadlig dos och gränsvärden i foder

USFDA har satt upp riktlinjer för maximal total mängd fumonisin B₁₋₃ i majs och majsprodukter som varierar mellan olika djurslag: exempelvis häst 5 ppm (max 20 % av dieten), gris 20 ppm (max 50 % av dieten), slaktkycklingar 100 ppm (max 50 % av dieten) och idisslare som föds upp för slakt 60 ppm (max 50 % av dieten). Det är endast rekommendationer som inte är lagligt bindande (U.S. Food and Drug Administration, 2014). EU-kommissionen har rekommenderade gränsvärden för fumonisin B₁ och B₂ i foder som varierar beroende på djurslag mellan 5 ppm för hästar, grisar, kaniner och sällskapsdjur, och 50 ppm för mink och vuxna däggdjur, t.ex. nötkreatur över 4 månaders ålder (EU-kommissionen, 2006).

Men det är inte bara mellan olika djurslag som känsligheten varierar, utan även på individnivå. I ett experiment av Ross *et al.* (1993) dog en häst som bara hade fått i sig 0,31 g FB₁, medan två andra hästar i samma experiment konsumerade över 40 g innan de dog. Dessa hästar fodrades med FB₁-kontaminerad majs i 3 olika faser: först fick de foder som innehöll 44 ppm FB₁ i upp till 98 dagar, sedan <1 ppm i 120 dagar och slutligen 88 ppm i 75 dagar. Fodergivan var 0,8 % av kroppsvikten plus hö (utan fumonisin). Den första hästen dog redan 9 dagar in i fas 1 och sedan avlivades ytterligare en 45 dagar in i experimentet. De hade båda utvecklat mild encefalopati och levernekroser. Under fas 2 återställdes blodvärdena till normala nivåer för de två kvarvarande hästarna. Efter 75 dagar i fas 3 dog den tredje hästen och den sista hästen avlivades efter 78 dagar – dessa hade båda ELEM och levernekroser. Värt att notera var att hästen som dog först visade sig ha leverfibroser som inte tros ha orsakats av FB₁. Det skulle kunna vara en förklaring till varför den var känsligare för FB₁ än de andra hästarna (Ross *et al.*, 1993). Även Wilson *et al.* (1992) utförde ett experiment på ponnyer för att undersöka vilken dos FB₁ som krävdes för att orsaka sjukdom. Fyra ponnyer fick FB₁ som varierade mellan <1 till 22 ppm och fem ponnyer fick 8 ppm under 180 dagar. I den första gruppen dog en ponny av ELEM efter 225 dagar varav de 55 sista utfodrades den med 22 ppm FB₁. Alla fem ponnyer i den andra gruppen fick övergående milda kliniska symptom och milda lesioner i hjärnan. Marasas *et al.*, (1988) fann i sitt experiment att hästar som fick en hög dos orsakade fatal hepatos men endast milda hjärnlesioner, medan en lägre dos tvärt om gav mild hepatos men allvarligare lesioner i hjärnan. Ett samband som Ross *et al.* (1993) inte kunde se i sitt experiment.

I en studie för att undersöka hur dos och tid för exponering av fumoninin påverkade de toxiska effekterna hos grisar, fick grupper av griskultingar 0, 10, 20 och 40 ppm (= mg/kg) FB₁ i fodret i 4 veckor, 0, 1, 5 och 10 ppm i 8 veckor, respektive 0, 1, 5, och 10 ppm i 20 veckor. Det var olika grisar i de tre olika experimenten, och i vardera experiment var det 5 grisar per dos. Lungödem uppstod vid dos på 10-40 ppm under 4 veckor, men även lägre doser på 1-10 ppm under 2-20 veckor gav upphov till irreversibel fibros i lungorna. Den lägsta dosen som inte gav en signifikant höjning av sfingonin i förhållande till sfingosin var foder med 1 ppm FB₁ (Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2002).

Diagnostik

För att fastställa förgiftning av FB₁ kan urin, blod eller vävnader provtas för att se om det finns förhöjda koncentrationer av sfingonin och mer sfingonin i förhållande till sfingosin. Dessa metaboliter kan användas som biomarkörer när fumonisin förgiftning misstänks hos ett djur (Riley *et al.*, 1998). Eftersom levern är ett målorgan kan ett blodprov tas med avseende på leverenzym, bilirubin och gallsyra som indikerar leverskada, men det är inte tillräckligt för att fastställa att fumonisin är orsaken eftersom leverskador kan ha många olika etiologier och dessutom varierar levervärdena mellan olika individer (Gumprecht *et al.*, 1998). Utöver det kan de typiska symptomen vid fumonisin förgiftning hos respektive djurslag som har beskrivits ovan ge en indikation, men eftersom symptomen kan vara diffusa kan de lätt misstas för andra sjukdomar. Något mer som kan tas in i beräkningarna är om djuret i fråga tros ha ätit foder som

sannolikt kan ha varit kontaminerat med fumonisinproducerande mögel; majs och majsprodukter är den främsta källan till fumonisinförgiftning och dåliga lagringsförhållanden med för hög fukt samt stora regnmängder innan skörd är riskfaktorer som kan ha i åtanke (Bhat *et al.*, 1997). Om foder från samma parti som det sjuka djuret har ätit av finns kvar kan det analyseras med t.ex. ELISA för att undersöka förekomsten av fumonisiner (Wang *et al.*, 2006).

DISKUSSION

Det har visats, både genom fältstudier och experimentella försök, att fumonisinproducerande mögel i fodret kan ge ett brett spektrum av olika patologiska förändringar som till viss del skiljer sig mellan olika djurslag. Verkningsmekanismen för FB₁:s toxicitet är dess förmåga att störa sfingolipidsyntesen genom att hämma ceramidsyntas (Wang *et al.*, 1991). Anledningen till att FB₁ kan ha så många olika effekter i kroppen är troligtvis för att det finns många olika typer av sfingolipider som deltar i upprätthållandet av olika funktioner i kroppen (Merrill *et al.*, 2001). Flera olika patogeneser har föreslagits:

ELEM som kännetecknas av kollikvationsnekroser och ödem i hjärnan skulle helt enkelt kunna bero på en brist på sfingolipider på grund av hämmad biosyntes, vilket hindrar tillväxten av neuronernas axoner som till stor del är uppbyggda av lipidmembran där sfingolipider är en viktig beståndsdel. Degeneration i CNS skulle alltså kunna vara en följd av detta (Harel & Futerman, 1993). Då uppkommer dock frågan varför LEM inte uppstår hos andra djurslag i så fall, utan bara hos hästar. Att FB₁ ger en ökad genomsläpplighet i endotel har visats *in vitro* men inte *in vivo*. Det hade annars kunnat vara en logisk förklaring till uppkomsten av ödem i hjärnan men även i t.ex. lungor som har förekommit, men inte är av så stor vikt, hos hästar. Skador på hjärt-kärlsystemet har visats orsakas av FB₁, och även det kan tänkas vara en del av förklaringen till de förändringar som ses i hästarnas hjärnor (Smith *et al.*, 2002). Då hästarna har relativt lång hals blir förändringen i blodtryck i huvudet betydande om det inte sker en automatisk reglering av kärlen när hästen höjer och sänker huvudet. Hypotesen som föreslås av Smith *et al.* (2002) är att den förhöjda sfingosinkoncentrationen, orsakad av FB₁, stör mekanismerna som normalt ger vasokonstriktion i rätt kärl när huvudet sänks mot marken och därmed förhindrar för högt blodtryck i hjärnan. Om detta inte sker kan det mycket väl leda till ödem då för mycket vätska tränger igenom blod-hjärnbarriären.

Vad gäller PPE är mekanismerna som tros ligga bakom ungefär desamma. En ökad endotelpermeabilitet föreslogs som en trolig orsak av Ramasamy *et al.*, (1995) men förkastas av Smith *et al.* (2000). Det verkar som en rimlig förklaring att ökad genomsläpplighet i de små kärlen i lungorna kan orsaka de ödem som har observerats, men än så länge har detta bara visats *in vitro*, vilket inte är tillräckligt som bevis, men ändå skäl att se det som en möjlig patogenes. Istället tror Smith *et al.* (2000) att vänstersidig hjärtsvikt, till följd av minskad kontraktilitet då sfingosin som ansamlas inhiberar kalciumkanaler i hjärtmuskulaturen, är den huvudsakliga förklaringen till lungödem.

Det har inte riktigt gått att utröna varför målorganen till viss del skiljer sig mellan olika djurslag, vilket hade varit intressant att se mer forskning på. Det är även stora individuella variationer i känslighet mot FB₁, i alla fall hos hästar (Ross *et al.*, 1993). Det är tänkbart att det beror på olika uppsättningar av transportörer och enzymer hos olika djurslag och individer som påverkar hur fumonisiner, sfinganolin och sfingosin metaboliseras och transporteras i kroppen, men utan vetenskapligt underlag blir detta bara spekulationer. En hypotes som har tagits upp är att grisars stora antal PIMs kan vara en anledning till att lungorna är ett målorgan hos grisar, eftersom sfinganolin skulle kunna inducera en ökad produktion av vasoaktiva mediatorer i dessa makrofager och i förlängningen bidra till ökad genomtränglighet av vätska från kapillärerna ut i lungorna (Gumprecht *et al.*, 1998). Även vad gäller leukoencefalomalaci, som endast har setts hos hästdjur, är det svårt att veta varför hjärnan är ett målorgan just hos hästar, speciellt då patogenesen inte är helt fastlagd än.

Att FB₁ är toxiskt för lever och njurar har visats hos flera djurslag, och patogenesen tros vara apoptos och hyperplasi p.g.a. inhibering av proteinkinase C som deltar i flera vitala funktioner i cellen (Stevens *et al.*, 1990). Proteinkinase C finns inte enbart i lever och njure, så anledningen till att dessa organ påverkas är förmodligen att det är här FB₁ ansamlas i högst koncentration (Prelusky *et al.*, 1994). Både lever och njure har stor blodgenomströmning och dessutom metabolisk kapacitet. Det är även tänkbart att njurarna, i alla fall hos vissa råtstammar, tar upp sfingolida baser som har bildats i andra vävnader till följd av fumonisinexponering och på så vis drabbas hårdare av förgiftningen (Riley & Voss, 2006).

Carcinogen effekt av fumonisin har påvisats i lever hos råttor (Gelderblom *et al.*, 1988) och misstänks kunna bidra till esofaguscancer hos människa (Yoshizawa *et al.*, 1994). Det verkar inte finnas några studier gjorda på andra djurslag, t.ex. häst och gris, med syfte att undersöka eventuell carcinogen effekt av fumonisin. Visserligen har inte tecken setts på det i de andra experiment där djur har tillförts fumonisiner, men eftersom det sker hos råttor vore det intressant med någon undersökning särskilt inriktad på om fumonisin kan vara carcinogent hos andra djurslag. Det skulle kanske kunna utvecklas vid långtidsexponering vid låg dos men inte vid kortare exponeringstid som i de flesta försök som har gjorts.

De rekommenderade maximala halterna av fumonisin i djurfoder skiljer sig lite mellan EU och amerikanska FDA, vilket kanske inte är så konstigt eftersom det inte heller bland forskarna verkar råda enighet om hur mycket som är säkert för konsumtion och stora individuella skillnader gör det svårt att sätta en gräns. USFDA rekommenderar max 20 ppm i fodret till gris, vilket är förvånansvärt högt eftersom griskultingar har visats få lungödem vid 10-40 ppm och irreversibel lungfibros redan vid 1-10 ppm (Zomborszky-Kovacs *et al.*, 2002). EU rekommenderar istället max 5 ppm. De studier som har gjorts på hästar visar lite olika resultat, vilket gör det svårt att säga vilken dos som är säker. Wilson *et al.* (1992) inducerade ELEM hos en ponny som fick 22 ppm FB₁ i 55 dagar, och 5 ponnyer som gavs 8 ppm fick alla milda kliniska symptom och hjärnlesioner. Både EU och USFDA rekommenderar max 5 ppm vilket tycks vara säkert åtminstone under kortare perioder, men det hade varit intressant att se en mer

långvarig studie för att se eventuella effekter av en låg dos under längre tid. Det finns inte olika gränsvärden för unga respektive vuxna djur varken för gris eller häst. Det hade annars kunnat tänkas att unga djur är känsligare för fumonisin, men där behövs mer forskning. Idisslare är inte lika känsliga för fumonisiner troligtvis p.g.a. mycket låg absorption från mag-tarmkanalen (Preluski *et al.* 1995), så gränsvärdena har satts högre för dem; EU 50 ppm och USFDA 60 ppm. Eftersom idisslars mag-tarmkanal skiljer sig markant från enkelmagade djur kan det tänkas att även enzymer och miljön i magarna skulle kunna bryta ner fumonisin och därmed bidra till minskad känslighet hos dessa djur.

Slutsats

Det finns en hel del forskning om fumonisiner, men det är fortfarande inte helt klarlagt hur patogenesen för ELEM och PPE ser ut, även om det finns flera teorier. Att FB₁ inhiberar ceramidsyntas och orsakar ansamling av sfingosin och sfinganin verkar vara accepterat av de flesta forskare, men vilka mekanismer som slutligen leder till de kliniska symptom och patologiska förändringar som har observerats är ännu inte besvarat med säkerhet. Skillnader mellan olika djurslag och individer är oklart vad det beror på. Att relativt mycket PIMs hos grisar kan vara anledningen till att lungorna är ett målorgan hos dem är en intressant teori, men även om det stämmer är det säkert inte hela sanningen. Absorption från tarmen är en faktor som kan vara en förklaring till att vissa djurslag påverkas mer än andra, men säger inget om skillnaderna mellan olika organ. Ytterligare forskning om FB₁:s kinetik skulle kanske kunna ge svar på den frågan; olika uppsättningar av transportörer i organen hos olika djur är en möjlighet som skulle kunna påverka. Vad gäller gränsvärden är det svårt att sätta en rimlig nivå. Hästar och grisar som är känsligast för fumonisin kan ta skada även av låga halter, men vissa individer tål betydligt mer. För att vara på säkra sidan bör därför fumonisinhalterna i fodret minimeras så mycket som möjligt till hästar och grisar, medan t.ex. idisslare klarar av att få i sig lite större mängder utan att bli sjuka.

REFERENSLISTA

- Bhat, R.V., Shetty, P.H., Amruth, R.P. & Sudershan, R.V. (1997). A Foodborne Disease Outbreak Due to the Consumption of Moldy Sorghum and Maize Containing Fumonisin Mycotoxins. *Clinical Toxicology*, 35: 249-255.
- Bolger, M., Coker, R.D., DiNovi, M., Gaylor, D., Gelderblom, W.C.A., Olsen, M., Paster, N., Riley, R.T., Shephard, G. & Speijers, G.J.A. (2001). Fumonisin. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Foods. *FAO Food and Nutrition Paper*, 74: 107.
- Caloni, F. & Cortinovis, C. (2010). Effects of fusariotoxins in the equine species. *The Veterinary Journal*, 186: 157–161.
- Constable, P.D., Smith, G.W., Rottinghaus, G.E. & Haschek, W.M. (2000). Ingestion of fumonisin B1-containing culture material decreases cardiac contractility and mechanical efficiency in swine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 162: 151–160.

- Dettbarn, C.S., Betto, R., Salviati, G., Palade, P., Jenkins, G.M. & Sabbadini, R.A. (1994). Modulation of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Ryanodine Receptor by Sphingosine. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2: 229–242.
- Dragan, Y.P., Bidlack, W.R., Cohen, S.M., Goldsworthy, T.L., Hard, G.C., Howard, P.C., Riley, R.T. & Voss K.A. (2001). Implications of Apoptosis for Toxicity, Carcinogenicity, and Risk Assessment: Fumonisin B1 as an Example. *Toxicological Sciences*, 61: 6-17.
- EU-kommissionen (2006). KOMMISSIONENS REKOMMENDATION av den 17 augusti 2006 om förekomst av deoxynivalenol, zearalenon, ochratoxin A, T-2 och HT-2 och fumonisiner i produkter avsedda för foder, (2006/576/EG).
- Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vleggaar, R. & Kriek, P.J. (1988). Fumonisins-Novel Mycotoxins with Cancer-Promoting Activity Produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and environmental biology*, 7: 1806-1811.
- Gumprecht, L.A., Beasley, V.R., Weigel, R.M., Parker, H.M., Tumbleson, M.E., Bacon, C.W., Meredith, F.I. & Haschek, W.M. (1998). Development of fumonisin-induced hepatotoxicity and pulmonary edema in orally dosed swine: morphological and biochemical alterations. *Toxicologic Pathology*, 26: 777–788.
- Harel, R. & Futerman, A.H. (1993). Inhibition of sphingolipid synthesis affects axonal outgrowth in cultured hippocampal neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 19: 14476-14481.
- Kellerman, T.S., Marasas, W.F.O., Thieu, P.G., Gelderblom, W.C.A., Cawood, M., & Coetzer J.A.W. (1990). Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 57: 269-275.
- Marasas, W. F. O., Kellerman, T. S. , Gelderblom, W. C. A., Coetzer, J. A. W., Thiel, P. G. & Van Der Lugt, J. J., (1988). Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 55: 197- 203.
- Merrill Jr., A.H., Sullards, M.C., Wang, E., Voss, K.A. & Riley, R.T., (2001). Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environmental Health Perspectives*, 109 (Supplement 2): 283–289.
- Morgavi, D.P. & Riley R.T. (2007). An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and Technology*, 137: 201–212.
- Norred, W.P., Plattner, R.D. & Chamberlain, W. (1993). Distribution and Excretion of [I4C] Fumonisin B1, in Male Sprague-Dawley Rats. *Natural toxins*, 6: 341-346.
- Osweiler, G.D., Ross, P.F., Wilson, T.M., Nelson, P.E., Witte, S.T., Carson, T.L., Rice, L.G., & Nelson, H.A. (1992). Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1: 53-59.
- Prelusky, D.B., Savard, M.E. & Trenholm, H.L. (1995). Pilot study on the plasma pharmacokinetics of fumonisin B1 in cows following a single dose by oral gavage or intravenous administration. *Natural Toxins* 3: 389–394.
- Prelusky, D.B., Trenholm, H.L. & Savard, M.E. (1994). Pharmacokinetic fate of 14C-labelled fumonisin B1 in swine. *Natural Toxins* 2: 73–80.

- Ramasamy, S., Wang, E., Henning, B & Merrill, A.H. (1995). Fumonisin B1 alters sphingolipid metabolism and disrupts the barrier function of endothelial cells in culture. *Toxicology and applied pharmacology*, 133: 343-348.
- Rheeder, J., Marasas, W., & Vismer, H. (2002). Production of Fumonisin Analogs by Fusarium Species. *Applied and environmental microbiology*, 5: 2101–2105.
- Riley, R.T. & Voss, K.A., (2006). Differential sensitivity of rat kidney and liver to fumonisin toxicity: organ-specific differences in toxin accumulation and sphingoid base metabolism. *Toxicological Sciences*, 92: 335–345.
- Riley, R.T., Wang, E., Schroeder, J., Smith, E.R., Plattner, R.D., Abbas, H., Yoo, W.-S. & Merrill, A.H. (1998). Evidence for Disruption of Sphingolipid Metabolism as a Contributing Factor in the Toxicity and Carcinogenicity of Fumonisin. *Natural toxins*, 1: 3-15.
- Ross, P.F., Ledet, A.E., Owens, D.L., Rice, L.G., Nelson, H.A., Osweiler, G.D. & Wilson, T.M. (1993). Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatosis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 1: 69-74.
- Smith, G.W., Constable, P.D., Bacon, C.W., Meredith, F.I. & Haschek, W.M. (1996a). Cardiovascular effects of fumonisin in swine. *Fundamental and Applied Toxicology*, 31: 169–172.
- Smith, G.W., Constable, P.D., Eppley, R.M., Tumbleson, M.E., Gumprecht, L.A. & Haschek-Hock, W.M. (2000). Purified fumonisin B1 decreases cardiovascular function but does not alter pulmonary capillary permeability in swine. *Toxicological Sciences*, 56: 240–249.
- Smith, G.W., Constable, P.D., Foreman, J.H., Eppley, R.M., Waggoner, A.L., Tumbleson, M.E. & Haschek, W.M. (2002). Cardiovascular changes associated with intravenous administration of fumonisin B1 in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 63: 538–545.
- Smith, G.W., Constable, P.D. & Haschek, W.M. (1996b). Cardiovascular responses to short-term fumonisin exposure in swine. *Fundamental and Applied Toxicology*, 33: 140–148.
- Stevens, V.L., Nirnkar, S., Jamison, W.C.L, Liotta, D.C. & Merrill, A.H. (1990). Characteristics of the growth inhibition and cytotoxicity of long-chain (sphingoid) bases for Chinese hamster ovary cells: evidence for an involvement of protein kinase C. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1051: 37-45.
- Sydenham, E.W., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., Thiel, P.G. and Hirookata, E.Y. (1992). Fumonisin Concentrations in Brazilian Feeds Associated with Field Outbreaks of Confirmed and Suspected Animal Mycotoxicoses. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 40: 994-997.
- U.S. Food and Drug Administration (07/07/2014). Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds; Final Guidance. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ucm109231.htm> (13/3/2015).
- Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.W., Riley, R.T. & Merrill, A.H. (1991). Inhibition of Sphingolipid Biosynthesis by Fumonisin - Implications for diseases associated with Fusarium moniliforme. *The Journal of Biological Chemistry*, 266: 14486-14490.
- Wang, S., Quan, Y., Lee, N. & Kennedy, I.R. (2006). Rapid Determination of Fumonisin B1 in Food Samples by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Colloidal Gold Immunoassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2491–2495.

- Wilson, T.M., Ross, P.F., Owens, D.L., Rice, L.G., Green, S.A., Jenkins, S.J. & Nelson, H.A. (1992). Experimental reproduction of ELEM A Study to determine the minimum toxic dose in ponies. *Mycopathologia*, 117: 115-120.
- Wilson, T.M., Ross, P.F., Rice, L.G., Osweiler, G.D., Nelson, H.A., Owens, D.L., Plattner, R.D., Reggiardo, C., Noon, T.H. & Pickrell J.W. (1990). Fumonisin B1 levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 3: 213-216.
- Yoshizawa, T., Yamashita, A. & Luo, Y. (1994). Fumonisin Occurrence in Corn from High- and Low-Risk Areas for Human Esophageal Cancer in China. *Applied and environmental microbiology*, 5: 1626-1629.
- Zomborszky-Kovacs, M., Kovacs, F., Horn, P., Vetési, F., Repa, I., Tornyos, G. & Tóth, Á. (2002). Investigations into the time- and dose-dependent effect of fumonisin B1 in order to determine tolerable limit values in pigs. *Livestock Production Science*, 76: 251–256.